



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication : **0 680 751 A1**

⑫

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt : **95400967.6**

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup> : **A61K 7/48, A61K 7/00,  
A23D 9/00, A23L 1/22**

⑭ Date de dépôt : **27.04.95**

⑯ Priorité : **02.05.94 FR 9405319**

⑰ Inventeur : **Voultoury, Robert  
6 Allée Charles Perrault  
F-92160 Antony (FR)**  
Inventeur : **Flavigny, Philippe  
11 Rue Chopin  
F-91790 Boissy sous Saint Yon (FR)**

⑯ Date de publication de la demande :  
**08.11.95 Bulletin 95/45**

⑰ Mandataire : **Le Guen, Gérard et al  
CABINET LAVOIX  
2, place d'Estienne d'Orves  
F-75441 Paris Cédex 09 (FR)**

⑯ Etats contractants désignés :  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL  
PT SE**

⑯ Demandeur : **LABORATOIRES DE BIOLOGIE  
VEGETALE YVES ROCHER  
La Croix des Archers  
F-56200 La Gacilly (FR)**

⑯ Vésicules lipidiques.

⑯ La présente invention a pour objet des vésicules lipidiques ayant une taille moyenne de 0,1 à 20 micromètres et comprenant une enveloppe constituée pratiquement de l'ensemble des protéines et des phospholipides présents dans les corps huileux des graines d'oléagineux entourant un noyau comprenant des lipides exogènes et/ou des substances lipophiles exogènes.

EP 0 680 751 A1

La présente invention concerne des vésicules lipidiques et des émulsions aqueuses les contenant et un procédé pour leur fabrication.

La présente invention concerne plus spécifiquement des vésicules lipidiques qui comprennent comme enveloppe les protéines et les phospholipides présents dans les graines d'oléagineux.

On a considéré jusqu'à présent que dans les graines d'oléagineux, l'huile (triglycérides essentiellement) était présente sous la forme de corps huileux d'un diamètre moyen de 1 à 10 micromètres comprenant un noyau central d'huile entouré d'une enveloppe constituée de protéines (oléosines) et de phospholipides (J. Tzen et al., J. Cell Bio, 117, 327, 1992).

On a maintenant découvert que les protéines constituant l'enveloppe des corps huileux sont de deux types : certaines protéines ne sont pas glycosylées et d'autres protéines sont glycosylées.

La présente invention a pour but de fournir des vésicules lipidiques qui comprennent l'ensemble des protéines et des phospholipides présents dans l'enveloppe des corps huileux et donc qui comprennent à la fois des protéines non glycosylées et des protéines glycosylées identiques à celles présentes dans l'enveloppe des corps huileux.

Par ailleurs, on sait que lors de l'extraction des huiles végétales des oléagineux, on récupère des tourteaux qui contiennent encore une fraction importante des protéines et des phospholipides présents dans l'enveloppe des corps huileux. Ces tourteaux contiennent en outre un taux d'huile non extraite qui peut représenter de 10 à 30 % en poids.

La présente invention vise plus spécifiquement à fournir de nouvelles vésicules lipidiques et des émulsions les contenant, en valorisant les tourteaux d'oléagineux.

A cet effet, la présente invention a pour objet des vésicules lipidiques ayant une taille moyenne de 0,1 à 20 micromètres, notamment 1 à 8 micromètres, et comprenant une enveloppe constituée pratiquement de l'ensemble des protéines et des phospholipides présents dans les corps huileux des graines d'oléagineux, entourant un noyau comprenant au moins des lipides exogènes et/ou des substances lipophiles exogènes.

L'invention a également pour objet une émulsion aqueuse comprenant des vésicules lipidiques selon l'invention dispersées dans une phase aqueuse.

Dans la présente invention l'expression "pratiquement l'ensemble des protéines et des phospholipides présent dans les corps huileux des graines d'oléagineux" signifie que l'on retrouve dans l'enveloppe des vésicules pratiquement les mêmes constituants que dans l'enveloppe des corps huileux et que les protéines comprennent à la fois des protéines non glycosylées et des protéines glycosylées. En pratique, les protéines et les phospholipides présents dans les graines d'oléagineux sont ceux présents

dans les tourteaux d'oléagineux.

L'invention a également pour objet un procédé de fabrication d'une telle émulsion aqueuse, qui comprend :

- 5 - le broyage de tourteaux d'oléagineux,
- l'addition aux tourteaux broyés d'une phase lipidique de façon à avoir un pourcentage global de lipides de 50 à 95 % en poids,
- 10 - le malaxage des tourteaux broyés et de la phase lipidique jusqu'à obtenir une pâte homogène, notamment à une température de 0 à 90° C,
- l'addition d'une phase aqueuse à la pâte dans un rapport pondéral pâte/phase aqueuse d'environ 40/60 à 5/95, notamment à une température de 0 à 90° C,
- 15 - l'agitation de la pâte et de la phase aqueuse pour former une émulsion,
- et éventuellement la décantation et/ou la filtration de l'émulsion pour éliminer les particules solides,
- 20 - et éventuellement la centrifugation de l'émulsion pour obtenir une émulsion concentrée.

Comme exemples de tourteaux d'oléagineux, on peut citer les tourteaux de soja, pistache, macadamia, tournesol, colza, arachide, amande, noisette, sésame, bourrache, germe de blé, jojoba. On utilise de préférence des tourteaux obtenus à partir de graines à forte teneur en huile (pistache, macadamia, arachide, jojoba, noisette, amande).

Le broyage des tourteaux peut être effectué par des broyeurs classiques, tels que des broyeurs à couteaux, avantageusement jusqu'à obtenir une taille de particules inférieure à 0,1 mm.

Les tourteaux broyés peuvent être éventuellement soumis à une irradiation pour une débactérisation jusqu'à une intensité de 10 kgray et conservés sous atmosphère inerte en emballage hermétiquement clos.

Par lipides exogènes on désigne les lipides d'apport, c'est-à-dire que l'on ajoute et qui ne sont pas présents dans les tourteaux broyés. Ces lipides que l'on ajoute aux tourteaux broyés peuvent être des lipides du même type que ceux présents dans l'oléagineux utilisé (lipides endogènes) ou d'autres lipides. En général, il reste dans les tourteaux une proportion relativement importante de triglycérides et l'on ajoute des lipides de façon à avoir un pourcentage global de lipides de 50 à 95 % en poids.

On règle la quantité de lipides en fonction de la taille des particules de l'émulsion finale que l'on veut obtenir. Ainsi, si l'on veut avoir des tailles de particules plus faibles, on diminue la quantité de lipides ajoutés.

Outre ces lipides, on peut ajouter des substances lipophiles telles que des vitamines (vitamines D, A, E, K), des filtres solaires (tels que Parsol MCX et Parsol 1789 de Givaudan ou de la benzophénone-3), des

mélanges lipophiles complexes (Titan M262CD de Kemira Oy) additionnés éventuellement d'huile minérale, de carotène, de silicone (par exemple DC 200 de Dow Corning), d'esters gras.

Le malaxage des tourteaux et de la phase lipidique ajoutée est alors effectué jusqu'à obtenir une pâte homogène. On opère avantageusement sous atmosphère non oxydante (sous vide ou sous azote).

Les vésicules lipidiques peuvent contenir de 0,01% à 100% en poids de lipides exogènes ou de substances lipophiles exogènes.

La phase aqueuse est ensuite ajoutée, avantageusement à température ambiante et sous atmosphère inerte (sous vide ou sous azote). Cette phase aqueuse peut comprendre, outre de l'eau, différents constituants hydrophiles.

L'addition de la phase aqueuse est généralement réalisée de façon à avoir un rapport pondéral pâte/phase aqueuse d'environ 40/60 à 5/95. On préfère un rapport 30/70 à 5/95.

Pour obtenir une émulsion, on soumet l'ensemble à une agitation qui peut être importante, à l'aide par exemple d'un broyeur colloïdal.

L'émulsion obtenue est alors soumise éventuellement à une décantation et/ou filtration, par exemple sur un tamis de 200 micromètres.

L'émulsion obtenue est relativement diluée et en général il est nécessaire de concentrer cette émulsion par centrifugation. A cet effet, on peut utiliser une centrifugeuse à assiettes adaptée au taux de la phase lipidique. Le produit obtenu est un concentrat de particules lipidiques dont le taux de composants lipophiles peut varier d'environ 20 à 70 % en poids suivant les conditions de fabrication.

Avant ou après cette centrifugation, la suspension lipidique peut subir un traitement thermique dont les conditions peuvent varier de 2 secondes à 10 minutes pour des températures de 80° C à 140° C. On peut alors procéder, si désiré, à une opération d'homogénéisation à l'aide d'un appareil de type Gaulin par exemple, laquelle opération peut avoir des conditions de pression variant de 5 à 400.10<sup>5</sup> Pa.

Ce concentrat de particules lipidiques peut être repris et dilué avec une phase aqueuse du type décrit plus loin. Cette phase aqueuse peut être épaisse à l'aide de gélifiants tels que gomme xanthane, gomme sclerane, bentone et dérivés, cellulose et dérivés, carbopol et dérivés, caroube, carraghénanes et dérivés, présents à des concentrations de 0 à 2 % en poids.

Le concentrat de particules lipidiques peut en outre être baratté suivant les techniques de laiteries pour obtenir un beurre que l'on comprime pour en exprimer l'eau.

Les émulsions ainsi obtenues ont en général des tailles moyennes de particules de 0,1 à 20 micromètres.

Les émulsions ainsi obtenues trouvent notamment des applications dans le domaine des produits

cosmétiques et la présente invention a également pour objet des compositions cosmétiques comprenant des vésicules lipidiques selon l'invention (par exemple des compositions hydratantes, des compositions de protection solaire, des compositions nourrissantes).

L'utilisation dans ces compositions d'un système émulsionnant naturel (oléosines, phospholipides) entraîne une meilleure tolérance cutanée du produit final.

Dans le cas de préparation d'une émulsion à usage cosmétique, on peut par exemple utiliser une phase aqueuse comprenant:

- Glycérine 5 à 10 %
- Propylène glycol 5 à 10 %
- Butane diol 5 à 10 %
- Urée 1 à 5%
- Sodium PCA 0,5 à 5 %
- EDTA 0,05 à 0,1 %
- Méthyl paraben 0,05 à 0,2 %
- Propyl paraben 0,05 à 0,1 %
- Butyl paraben 0,05 à 0,1 %
- Ethanol 0,05 à 0,5 %
- B H T 0,05 à 1 %
- Alginate de sodium 1 à 5 %
- Vitamine C et dérivés 0,05 à 1 %
- Vitamine B et dérivés 0 à 1 %
- Acide sorbique 0 à 1 %
- Préparations aqueuses diverses d'oligo-éléments
- Sulfite de sodium 0 à 0,4 %.

Les émulsions selon l'invention trouvent également des applications dans le domaine des produits alimentaires. La présente invention a donc également pour objet des compositions alimentaires comprenant des vésicules lipidiques selon l'invention. Comme exemple on peut citer des suppléments lactés vitaminés sans cholestérol, des desserts lactés fermentés, des yaourts et des crèmes fouettées. Les desserts lactés fermentés et les yaourts peuvent être fabriqués par addition de souches de lactobacilles à une émulsion selon l'invention puis incubation 5 heures à 35° C environ. Les crèmes fouettées peuvent être obtenues par addition de 90 parties d'un propulseur (CO<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>O) à 10 parties d'une émulsion concentrée selon l'invention, additionnée des additifs alimentaires habituels (arômes et sucre).

Les émulsions selon l'invention trouvent également des applications dans le domaine des produits pharmaceutiques à usage humain ou vétérinaire, en liaison avec les qualités intrinsèques des oléosines (petite taille et lipophilie).

La présente invention a ainsi également pour objet des compositions pharmaceutiques. Comme exemple on peut citer des compositions pour l'apport de vitamine E, de vitamines D ou d'hormones via des patchs transdermiques.

En outre, il est à noter que les émulsions obte-

nues comprennent des protéines qui présentent une grande similitude avec les apolipoprotéines des mammifères; autrement dit, on pense que les lipases des mammifères reconnaissent les protéines des émulsions selon l'invention, ce qui permet la fixation des lipases sur les membranes des particules et par suite la dégradation des lipides substrats des lipases concernées.

Les exemples suivants illustrent la présente invention.

#### EXEMPLE 1

On broie un tourteau d'arachide à l'aide d'un broyeur à couteaux jusqu'à obtenir une taille inférieure à 0,1 mm environ.

Le tourteau contient 20 % en poids environ de triglycérides.

On ajoute à 50 parties de tourteau broyé 50 parties d'huile végétale (triglycérides d'arachide ou autre oléagineux). L'ensemble est malaxé sous vide à température ambiante jusqu'à obtenir une pâte homogène.

On ajoute à cette pâte 900 parties d'eau. On soumet l'ensemble à température ambiante et sous vide à une vive agitation à l'aide d'un broyeur colloïdal réglé sur l'ouverture maximale.

On filtre sous tamis de 200 micromètres. On centrifuge éventuellement le filtrat qui est un lait très fluide dans une centrifugeuse de laiterie.

On obtient un concentrat de particules lipidiques ayant une taille moyenne de 3 micromètres, contenant environ 60 % de triglycérides.

#### EXEMPLE 2

On opère comme à l'exemple 1 avec un tourteau de macadamia (contenant 25 % en poids de triglycérides), en ajoutant à 30 parties en poids de tourteaux, 70 parties en poids de triglycérides (huile de macadamia ou d'autres oléagineux).

L'eau est ajoutée à la pâte à raison de 900 parties en poids.

On obtient finalement un concentrat de particules lipidiques ayant une taille moyenne de 3 micromètres, ce concentrat contenant environ 60 % de triglycérides.

On donnera ci-après des exemples de compositions obtenues selon le procédé de l'invention.

#### Exemple A - Lait pour le visage

. Eau qs. 100 %  
 . Gomme xanthane 1 à 2 %  
 . Concentrat A 20 à 40 %  
 . Parfum 0,1 à 0,5 %  
 . Conservateurs qs.

Le concentrat A est fabriqué comme décrit à

l'exemple 1, à partir d'une huile végétale.

Le pH varie de 5,5 à 6,5 (qs = acide citrique). Viscosité de 2000 à 3000 cP.

#### 5 Exemple B - Lait solaire écran total

. Eau qs 100 %  
 . Gomme xanthane 1 à 2 %  
 . Concentrat B 20 à 40 %  
 . Parfum 0,1 à 0,5 %  
 . Conservateurs qs

Le concentrat B est fabriqué comme décrit à l'exemple 1, à partir d'une huile composée par exemple de :

. Triglycérides qs 100 %  
 . PARSON 1789 1 à 5 %  
 . PARSON MCX 1 à 15 %  
 . TITAN M262CD 1 à 10 %

Le pH varie de 5,5 à 6,5 (qs = acide citrique). Viscosité de 2000 à 3000 cP.

#### Exemple C - Lait hydratant pour le corps

. Eau qs 100 %  
 . Glycérine 5 à 10 %  
 . Gomme xanthane 1 à 2 %  
 . Urée 1 à 5 %  
 . Concentrat C 20 à 40 %  
 . Parfum 0,1 à 0,5 %  
 . Conservateurs qs

Le concentrat C est fabriqué comme décrit à l'exemple 1, à partir d'huile végétale additionnée d'esters gras du jojoba (5 à 10 %).

Le pH varie de 6,0 à 6,5 (qs = acide citrique), la viscosité de 2000 à 3000 cP.

#### Exemple D - Supplément lacté vitaminé sans cholestérol

. Eau qs 100 %  
 . Vitamine C 1 %  
 . Gomme xanthane 0,5 à 1 %  
 . Concentrat D 20 à 40 %  
 . Extrait de vanille qs  
 . Conservateurs qs

Le concentrat D est fabriqué comme décrit à l'exemple 1, à l'aide d'huile à forte teneur en triglycérides gamma linoléniques additionnée de vitamine D (500 UI/g max) ou A (1500 UI/g max).

Les conservateurs pourront être éliminés si les conditions suivantes sont adoptées :

- débactérisation initiale du tourteau,
- traitement UHT (120° C x 3 secondes) de la suspension, avant ou après les ajouts décrits,
- conservation en Tétrapak ou équivalent, sinon, les conservateurs alimentaires seront choisis, et de préférence :
- acide sorbique

- parabens divers
- sodium sulfite
- BHT

le pH sera réglé à  $6,5 \pm 0,2$  à l'aide d'acide citrique.

On donnera ci-après des résultats d'essais mettant en évidence les natures différentes des protéines présentes dans l'enveloppe des corps huileux.

### EXEMPLE 3

On a procédé comme à l'exemple 2 en partant d'un tourteau de macadamia.

A partir d'un concentrat de vésicules lipidiques, on a séparé les protéines par la méthode sur gradients d'urée après extraction des lipides à l'éther diéthylique (Millichip, Colloque Int. Lipides Végétaux).

Les protéines ont été remises en solution dans un tampon Tris/HCl 10 mM, SDS 0,07 M, pH 8.

La purification des protéines a été réalisée par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Superose 6 équilibrée et éluee en tampon Tris/HCl 10 mM SDS 0,07 M, pH 8,2.

On a séparé 50 fractions et testé les fractions 7, 36 et 43 correspondant à des pics d'élution. A cet effet on a utilisé une technique de type "dot-blot" avec un sérum dirigé contre la  $\beta$ -glucosidase du soja qui réagit avec les motifs glucidiques complexes communs à la plupart des plantes, qui contiennent des résidus  $\alpha$ -1-3 glucose et  $\beta$ -1-2-xylose.

Les fractions 7 et 36 sont reconnues par le sérum dirigé contre la  $\beta$ -glucosidase, ce qui n'est pas le cas de la fraction 43. La reconnaissance est donc imputable à la présence de chaînes glycosidiques dans les fractions 7 et 36 qui n'apparaissent pas pour la fraction 43.

### **Revendications**

1. Vésicules lipidiques ayant une taille moyenne de 0,1 à 20 micromètres et comprenant une enveloppe constituée pratiquement de l'ensemble des protéines et des phospholipides présents dans les corps huileux des graines d'oléagineux, entourant un noyau comprenant des lipides exogènes et/ou des substances lipophiles exogènes.
2. Vésicules lipidiques selon la revendication 1, dans lesquels les protéines et les phospholipides sont ceux présents dans les tourteaux d'oléagineux.
3. Emulsion aqueuse comprenant des vésicules lipidiques selon la revendication 1 ou la revendication 2 dispersées dans une phase aqueuse.
4. Procédé de fabrication d'une émulsion aqueuse

selon la revendication 3, qui comprend :

- le broyage des tourteaux d'oléagineux,
- l'addition aux tourteaux broyés d'une phase lipidique de façon à avoir un pourcentage global de lipides de 50 à 95 % en poids,
- le malaxage des tourteaux broyés et de la phase lipidique jusqu'à obtenir une pâte homogène,
- l'addition d'une phase aqueuse à la pâte dans un rapport pondéral pâte/phase aqueuse d'environ 40/60 à 5/95,
- l'agitation de la pâte et de la phase aqueuse pour former une émulsion,
- et éventuellement le décantation et/ou la filtration de l'émulsion,
- et éventuellement la centrifugation de l'émulsion pour obtenir une émulsion concentrée.

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel on effectue l'addition de la phase aqueuse et son mélange avec la pâte à température ambiante.
6. Procédé selon la revendication 4 ou la revendication 5, dans lequel on effectue l'addition de la phase aqueuse et son mélange avec la pâte sous atmosphère non oxydante.
7. Procédé selon l'une des revendications 4 à 6, dans lequel on effectue en outre un barattage de l'émulsion concentrée.
8. Composition cosmétique comprenant des vésicules lipidiques selon la revendication 1.
9. Composition alimentaire comprenant des vésicules lipidiques selon la revendication 1.
10. Composition thérapeutique comprenant des vésicules lipidiques selon la revendication 1.



## DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.)
D,A	J. OF CELL BIOLOGY, vol.117, no.2, Avril 1992, US pages 327 - 335 TZEN ET AL. 'SURFACE STRUCTURE AND PROPERTIES OF PLANT SEED OIL BODIES' * le document en entier * ---	1-10	A61K7/48 A61K7/00 A23D9/00 A23L1/22
A	WO-A-91 11169 (BONNE AT AL.) * le document en entier * ---	1-10	
A	PARFUMS, COSMETIQUES, AROMES, vol.56, Mai 1984, FR page 57 RAYMOND ET AL. 'LES PROTEINES D'OLEAGINEUX: PROPRIETES FONCTIONNELLES UTILISABLES EN COSMETOLOGIE' * le document en entier * -----	1-10	
DOMAINE TECHNIQUE RECHERCHE (Int.Cl.)			A61K A23D A23L
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	10 Août 1995	Fischer, J.P.	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			